

ヒト血漿 Angiotensin II の高感度 Direct Radioimmunoassay とその臨床応用

西 谷 隆 宏 島 本 和 明
札幌医科大学内科学第2講座 (主任 飯村 攻 教授)

A Very Sensitive Direct Radioimmunoassay of Human Plasma Angiotensin II and Its Clinical Application

Takahiro NISHITANI and Kazuaki SHIMAMOTO
Department of Internal Medicine (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. O. Imura)

A very sensitive and simplified direct radioimmunoassay system for plasma angiotensin II was developed. The establishment of this radioimmunoassay proved successful by using the highly sensitive and specific antiserum against synthetic angiotensin II (final dilution; 1:1, 500,000) in combination with ^{125}I labeled angiotensin II (specific activity; $1,600 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). In this assay system, it was possible to carry out a direct assay using $100 \mu\text{l}$ of plasma without any extraction procedure. This possibility was supported by a 100% recovery, parallelism of plasma samples against the standard curve, and no significant difference and a high positive correlation between the values measured by this direct assay and those by the Dowex column extraction method reported previously. The sensitivity of this assay system was $0.1 \text{ pg}/\text{tube}$, which is the highest sensitivity in any study reported up to the present time. The cross-reactivities of angiotensin III and I against this antiserum were 100% and less than 0.1%, respectively, suggesting that the antiserum was very specific for the C-terminal of angiotensin II.

Because of the low cross-reactivity to angiotensin I, it was shown that this assay system was applicable in the measurement of plasma angiotensin II levels in the state of converting enzyme inhibitor administration. Plasma angiotensin II levels in normal subjects after overnight fasting ranged from 2.5 to $21.3 \text{ pg}/\text{ml}$ ($12.2 \pm 1.9 \text{ pg}/\text{ml}$, mean \pm SEM). In patients with essential hypertension, plasma angiotensin II levels were similar in the normal renin group, the lower in low renin group, and higher in the high renin group, respectively, compared to those in normal subjects. In patients with secondary hypertension, the levels were significantly lower in those with primary aldosteronism and higher in those with renovascular hypertension when compare to normal subjects. (Received August 6, 1987 and accepted September 27, 1987)

Key words: Plasma angiotensin II, Direct radioimmunoassay, Essential hypertension, Secondary Hypertension, Angiotensin converting enzyme inhibitor

1 緒 言

Renin-angiotensin-aldosterone 系は交感神経系と共に主要な昇圧系の1つとして、血圧調節や水、電解質代謝に関わり、さらには各種高血圧疾患における病因、病態生理に重要な役割を果しているものと考えられている。ことに最近、angiotensin-analogue¹⁻³⁾や

angiotensin I converting enzyme inhibitor⁴⁻⁷⁾の開発に伴い、高血圧症における本系の病態生理学的役割は、この面からの検討も加えられるようになってきた。しかし、この系に関して、本来の生理的活性物質の中心である angiotensin II 自体の検索には未だ充分なものがない。

Renin は糸球体輸入細動脈に付随する傍糸球体細胞

内で、血漿蛋白中の α -グロブリン分画中に存在する基質 angiotensinogen に作用して、decapeptide である angiotensin I を遊離する。Angiotensin I は生体内では主に肺を循環する間に変換酵素により、C 末端より His⁹-Leu¹⁰ を切離し、分子量約 1,000 の octapeptide である angiotensin II となる。Angiotensin II は生体内で最も強力な血管収縮作用を有すると共に、他方では副腎皮質球状層に作用して aldosterone の分泌を促進する。このように本系では renin 自体が実際の血管作動物質ではなく、これにより生成される angiotensin II が昇圧活性を発現している。

今日迄、本系に関わる検討は、主に血漿中の renin 活性測定によってきたが、本系の昇圧活性物質である angiotensin II は簡便、かつ正確に測定することが難しく、測定法上の煩雑さ、困難さゆえにその計測は一般化されるには至らなかった。事実、現在迄、数多くの angiotensin II の radioimmunoassay が報告されてきたが⁸⁻¹⁶⁾、我々の既報の方法¹⁶⁾を含め、そのほとんどは、測定感度が十分でなく血漿試料からの angiotensin II の抽出、濃縮操作を必要とするものであった。そして、direct radioimmunoassay に関しては、今日迄、その報告をみない。その理由の一端には、従来使用されていた angiotensin II の抗体がかなりの程度に angiotensin I と交差するなど、特異性や高い感度に欠けていた点がまずあげられよう。我々は上述の諸条件を克服し、容易で精度の高い angiotensin II の測定法開発をこころみてきたが、今回、高感度、かつ特異性にすぐれた angiotensin II の抗体作製に成功し、100 μ l の血漿量で、抽出操作を必要とせず測定可能な、極めて簡便なヒト血漿 angiotensin II の direct radioimmunoassay を確立した。本稿では、その詳細を述べると共に、その測定法を用いて、各種高血圧症における血漿の angiotensin II の動態を計測したので、その結果を併せて報告する。

2 方法・対象

2.1 抗体の作製

抗体は Goodfriend *et al.* の方法¹⁷⁾ に準拠し、その一部を改良し、合成 angiotensin II (ペプチド研究所、大阪) にウシ血清アルブミン (BSA) を結合させたものを用いて作製した。すなわち、11 mg の BSA を 1.2 ml の精製水に溶解し、5.6 mg の合成 angiotensin II を溶解混和した。この溶液に 0.5 ml の再蒸留水で溶かした 50 mg の 1-ethyl-3 (dimethyl aminopropyl)-carbodiimide (Sigma Chemical Company, St,

Louis, MO) を加えて混和し、2 時間室温にてインキュベーションした後、4℃にて 12 時間の透析を行い、次いでこの溶液を凍結乾燥した。抗体作製にあたっては、これを 0.9% 食塩水に溶解し、等量の complete Freund's adjuvant (Defco Laboratories, Detroit, MI) を加えて、エマルジョン化したものを用い、3 羽の雌 albino rabbit に 2 週間毎に 3 回皮下注射した。なお、1 回の注射液には BSA に結合した 0.7~0.8 mg の angiotensin II が含まれていた。免疫された rabbit からの採血は最終免疫後 2 週間毎に施行し、その都度抗体の力価を検討した。

2.2 標識抗原の作製

標識抗原は Greenwood and Hunter の chloramine T 法¹⁸⁾ 変法により、合成 angiotensin II を¹²⁵I で標識して作製した。すなわち、0.01 M 酢酸 5 μ l に溶解した 5 μ g の合成 angiotensin II と、0.5 mCi の [¹²⁵I]-ヨウ化ナトリウム (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) を 20 μ l の 0.5 M phosphate buffer (pH 7.4) と共に混和後、chloramine T 溶液 (5 μ g/ μ l, 0.05 M phosphate buffer: pH 7.4) を加えることにより反応を開始した。45 秒間の室温でのインキュベーション後、この混液を 0.5% BSA を含む 0.01 M 酢酸で平衡化した 0.7 \times 20 cm superfine Sephadex G25 column を用いて、上記緩衝溶液にて溶出した。そして、溶出液各 1 ml ずつの画分中の放射活性を Well type gamma spectrometer (Beckmann Instrument, Palo Alto, CA) にて測定した。なお、標識された angiotensin II のピークを確認する目的で、各画分から得た 10,000 cpm/100 μ l \cdot assay buffer の標識抗原と assay buffer で溶解した過剰の家兎抗 angiotensin II 抗体 (3,200 倍, 100 μ l) に 400 μ l の assay buffer を加えたものを、室温にて 24 時間インキュベーションし、各画分の放射活性の抗体との結合能を検討した。

2.3 Angiotensin II の radioimmunoassay の手順

Angiotensin II の radioimmunoassay の手順を Fig. 1 に示す。Assay tube としては 12 \times 75 mm ポリエチレン試験管、assay buffer としては 1% BSA を含む phosphate buffered saline (PBS: 0.14 M NaCl in 0.01 M phosphate: pH 7.0) をそれぞれ用いた。まず、assay buffer にて種々の濃度に溶解した合成 angiotensin II (0.05~25 pg/tube) 100 μ l、または血漿試料 100 μ l を assay tube にいれ、300 μ l の assay buffer と混和した。次に、抗血清は assay buffer にて 250,000 倍に希釈したものを 100 μ l ずつ各 tube に加え、最終希釈 1,500,000 倍で使用した。なお、この抗血清濃度は標識

Direct Radioimmunoassay of Angiotensin II

Plasma or standard	100 μ l
+	
Assay diluent (1% BSA in PBS)	300 μ l
↓	
Anti-angiotensin II serum (1:250,000)	100 μ l
12 hrs. at 4°C	
↓	
¹²⁵ I-angiotensin II (3,000 cpm)	100 μ l
48 hrs. at 4°C	
↓	
1.25% bovine γ -globulin in PBS	300 μ l
↓	
31.25% polyethylene glycol in PBS	800 μ l
Centrifuge at 3,000 rpm for 30 min. at 4°C	
↓	
Decant the supernatant	
↓	
Count the precipitate radioactivity	
BSA: bovine serum albumin	
PBS: phosphate buffered saline	

Fig. 1 Assay procedure for measurement of plasma angiotensin II, established in this study.

angiotensin II と 30%~35% の結合率を示した。

各 tube を 4°C にて 12 時間インキュベーションした後、assay buffer 100 μ l に溶解した標識抗原 3,000 cpm をこれに加え、最終インキュベーション容量を 600 μ l とした。ついで、4°C 48 時間のインキュベーション後、¹²⁵I-angiotensin II の抗体結合型と遊離型を分離した。この分離には polyethylene glycol (PEG) 法¹⁹⁾を用い、1.25% ウシ γ -グロブリンを含む PBS と 31.25% PEG を含む PBS を加えて混和し、4°C、3,000 rpm、30 分遠心分離後、遊離型を含む上清を吸引して、結合型を含む沈澱物の放射活性を Well type gamma spectrometer にて測定した。Control tube には標準物質、血漿試料を含まないものを用いた。沈澱物の放射活性は抗体を含まない blank tube の放射活性を引いた後、control tube (Bo) に対する百分率 (%) で表現した。

2.4 血漿 angiotensin II の radioimmunoassay に関する基礎的検討

2.4.1 再現性の検討

血漿 angiotensin II の radioimmunoassay に関する基礎的検討として、正常者 1 例の同一血漿を用いて、1

回の測定で 5 検体を同時に測定した。さらに各 5 検体を用いて 4 回の異なった測定により、同一検体の血漿 angiotensin II 濃度測定 of 再現性を測定内誤差、測定間誤差の面より検討した。

2.4.2 回収率の検討

回収率は 4 例の正常者血漿検体に既知量 (血漿 1 ml 当りの量として、12.5, 25, 50 pg) の合成 angiotensin II を加え、angiotensin II 非添加検体濃度との差より計算した。

2.4.3 Dowex 法の比較

既報の Dowex による抽出法¹⁶⁾を用いた測定法と対比すべく、正常者 17 例の血漿を用い、Dowex column にて抽出後、本 RIA で測定し、Dowex 法の回収率で補正した値と、本 direct RIA 法にて求めた値を比較検討した。

2.5 正常血圧者と高血圧患者の血漿 angiotensin II 濃度

心血管系、肝、腎、内分泌、代謝性疾患のない正常血圧者 11 例 (20~65 歳、平均 40.5 \pm 3.6 歳、mean \pm SEM) と以下の疾患群を対象に、血漿 angiotensin II 濃度を測定した。対象とした疾患群は本態性高血圧患者 79 例 (20~55 歳、低 renin 群: 24 例、20~54 歳、37.3 \pm 3.4 歳、正 renin 群: 50 例、23~55 歳、40.9 \pm 1.7 歳、高 renin 群: 5 例、28~41 歳、36.5 \pm 4.3 歳) 腎血管性高血圧患者 3 例 (27~43 歳、34.5 \pm 7.6 歳) 慢性糸球体腎炎患者 8 例 (腎不全例 3 例: 32~49 歳、41.2 \pm 6.7 歳、非腎不全例 5 例: 31~54 歳、46.7 \pm 4.1 歳)、原発性 aldosterone 症患者 5 例 (32~52 歳、41.5 \pm 5.0 歳) である。測定対象者はいずれも、入院後、常食 (Na 120 mEq/日、K 75 mEq/日) 下に、すべて薬剤を少なくとも 2 週間中止し、その後早朝安静臥床下に肘静脈より採血した。血液試料は血液 1 ml に対して 1 mg の EDTA-2Na を含む tube に移し、すみやかに 4°C 下で遠心分離し、血漿分離後測定まで -20°C 下に凍結保存した。

2.6 Angiotensin II 濃度に対する captopril の影響

3 例の本態性高血圧患者に早朝安静臥床下、captopril 50 mg を経口投与し、投与前、投与後 30 分、60 分、120 分、180 分の時点で採血し、血漿 angiotensin II 濃度を測定した。

2.7 統計処理

平均値は平均 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) として表し、統計処理には unpaired の Student's t-test を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

3 結 果

3.1 抗血清について

使用した3羽の家兎にはいずれも、最終免疫後2週間目より抗 angiotensin II 抗体を認めたが、このうち1羽で極めて高力価の抗体がえられた。この1羽の抗体力価は最終免疫後4ヵ月まで次第に上昇し、以後は徐々に低下した。なお、以後の研究には4ヵ月の時点の抗血清を用いた。本抗血清の希釈曲線をFig.2に示すが、最終希釈64万倍で標識抗原と50%結合し、実際には、抗血清が標識抗原と30~35%の結合を示す最終希釈150万倍にて使用可能であった。

3.2 標識 angiotensin II の精製

Angiotensin II は chloramine T 法による¹²⁵I で標識後、superfine Sephadex G25 column chromatography にて 0.01 M 酢酸により溶出した。Fig.3 にはその際の 1 ml ずつの各画分の放射活性と、過剰な抗体との結合能を示す。放射活性は3つのピークを示したが、各画分の抗体との特異的結合をみると、第3のピークのそれのみが90%以上を示した。第1及び第2のピークの特異的結合率は極めて低い値であった。以上より、第3のピークが標識 angiotensin II で、第1のピークが aggregates、第2のそれは column の total volume と一致することより free iodine と考えられた。なお、

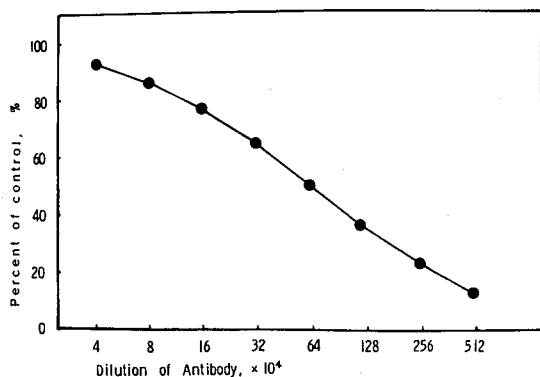


Fig. 2 Antiserum titration curve. The tubes, containing 400 μ l of assay buffer, 100 μ l of various diluted antisera, and 100 μ l of ¹²⁵I-labeled angiotensin II (3,000 cpm), were incubated at 4°C for 48 hours. After the incubation, antibody-bound angiotensin II was separated from free hormone by the PEG method.¹⁹⁾ The antiserum titration curve shows that 50% of the added tracer was bound using a final antiserum dilution of 1:640,000. Ordinate: Percent of antibody-bound ¹²⁵I-angiotensin II, Abscissae: Scale of antiserum dilution

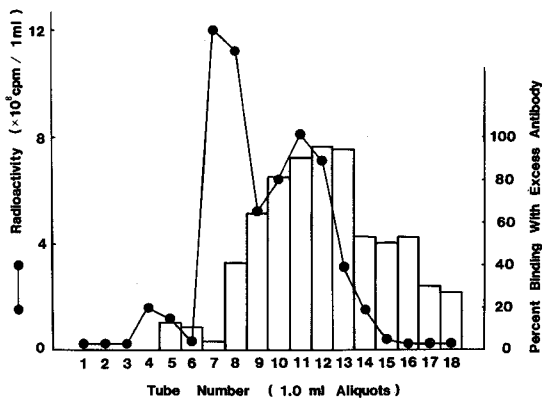


Fig. 3 Purification of iodinated angiotensin II. The distribution of total radioactivity (●—●) and radioactivity bound to excess antibody (□) in the eluate fractions (1.0 ml/ each) from a 0.7 \times 20cm Sephadex G-25 superfine column is shown. To determine radioactivity bound to antiserum, tubes containing 400 μ l of assay buffer, 100 μ l of antiserum (1:3,200), and aliquots from each tube containing 3,000 cpm in 100 μ l of assay buffer were incubated at 4°C for 48 hours. After the incubation antiserum-bound angiotensin II was separated from free hormone by the PEG method.¹⁹⁾ More than 90% of the iodinated angiotensin II was precipitable by the antiserum in the third peak, while the first peak was aggregates, and the second one, free iodine.

blank tube における沈澱の放射活性、すなわち非特異的結合は加えられた総放射活性の5%以下であった。第3のピークの、superfine Sephadex G25 column chromatography にて再純化後の比放射能は1600 μ Ci/ μ g と良好であった。また、標識抗原は-20°Cで保存した場合、少なくとも2ヵ月間は安定であった。

3.3 特異性

Fig.4 に angiotensin I, angiotensin II, angiotensin III の標準曲線とヒト血漿の希釈曲線を示す。この図からも明らかなごとく、angiotensin II と angiotensin III は、ほぼ同一の標準曲線を示した。一方、angiotensin I は 100 pg/tube まで濃度を上げて、angiotensin II とは交差を認めず、angiotensin II に対する angiotensin I の交差反応は0.1%以下であった。また、ヒト血漿の用量反応曲線は angiotensin II の標準曲線と良好な平行関係を示した。

3.4 測定感度

最小検出量としては5回の測定で得られた angiotensin II の標準曲線において、0.1 pg/tube における B/Bo が $95.6 \pm 2.3\%$ であったことより、本測定系の測定

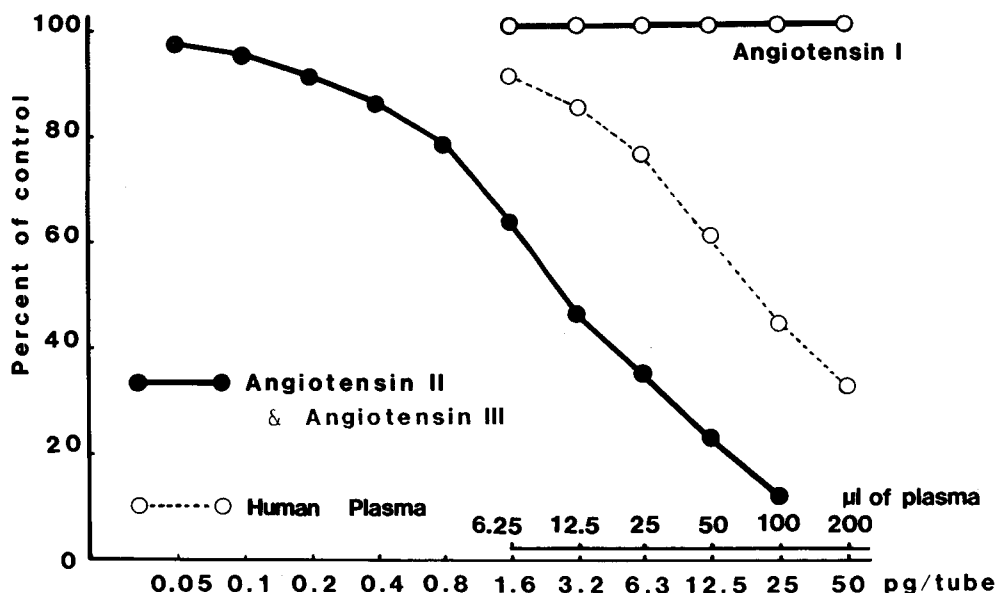


Fig. 4 Standard curves of angiotensin I, II and III, and the dilution-curve of human plasma. Against angiotensin II antiserum, angiotensin III and I showed 100% and less than 0.1% cross-reactivity, respectively.

感度は0.1 pg/tubeと考えられた。

3.5 再現性

同一の5検体を1回のassayで測定した際の血漿angiotensin II濃度の平均は 16.7 ± 0.52 pg/mlであり、これより求めた測定内誤差は4.3%となった。また、同一検体を異なる4回のassayで測定した際の血漿angiotensin II濃度の平均は 18.0 ± 0.963 pg/mlとなり、これより求めた測定間誤差は $5.4 \pm 3.4\%$ といずれもすぐれた再現性を示した。

3.6 回収率

既知量(血漿1 ml 当りの量として12.5, 25, 50 pg)の合成angiotensin IIを異なる4例のヒト血漿に加えて検討した際の回収率をTable 1に示す。いずれも

Table 1 Recovery of angiotensin II from human plasma sample

Amounts of added angiotensin II pg/ml	Measured value pg/ml	Recovered value pg/ml
0	13.7 ± 0.75 (n=4)	—
12.5	27.0 ± 1.39 (n=4)	13.4 ± 0.85
25.0	40.6 ± 2.14 (n=4)	26.9 ± 4.20
50.0	63.1 ± 2.19 (n=4)	49.3 ± 4.90

Each value represents mean \pm SEM. Average recovery of angiotensin II (n=12) was $104.8 \pm 2.9\%$ (mean \pm SEM).

91~108%の回収率を示し、平均 $104.8 \pm 2.9\%$ とほぼ100%の回収率がえられた。

3.7 Dowex 法と本 direct radioimmunoassay 法の比較

17例のヒト血漿を用い、plasma angiotensin II濃度を従来のDowex column extraction法¹⁰⁾と、本研究により開発されたdirect radioimmunoassay法の両方で測定して対比した。本direct radioimmunoassay法による測定値は 16.0 ± 3.0 pg/mlで、Dowex法によるそれは 22.0 ± 2.6 pg/mlと、前者がやや低値を示すものの両者間には有意の差が認められなかった(Fig. 5)。そして、血漿angiotensin IIの両測定値間には良好な有意の正相関($r=0.943$, $p<0.01$)が認められた(Fig. 6)。

3.8 正常血圧者と各種高血圧患者における血漿angiotensin II濃度

正常血圧者、低renin、正renin、高renin本態性高血圧患者、腎血管性高血圧患者、高血圧症を伴う慢性糸球体腎炎患者(腎不全を伴う群、伴わない群)、及び原発性aldosterone症患者の血漿angiotensin II濃度をFig. 7に示す。本direct radioimmunoassay法により計測された血漿angiotensin II濃度は、それぞれ 12.2 ± 1.9 (2.5~21.3), 6.1 ± 0.8 (2.0~14.4), 12.2 ± 1.4 (2.0~51.9), 36.0 ± 6.3 (17.3~54.0),

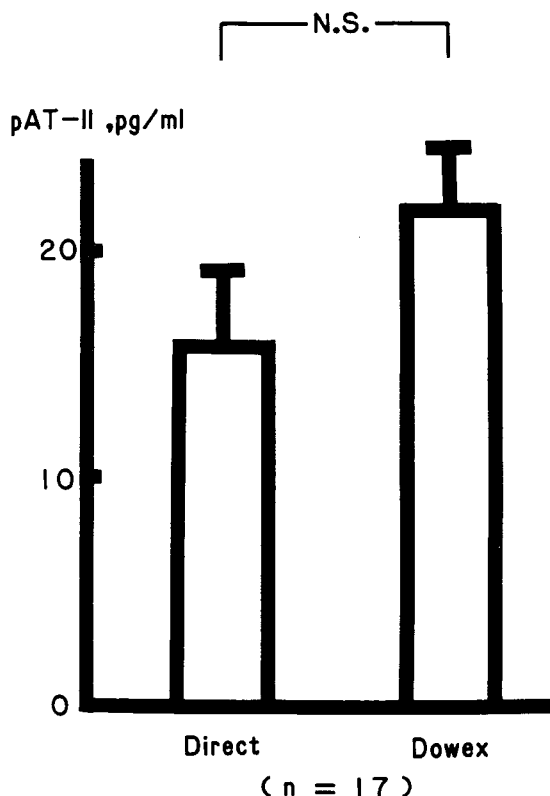


Fig. 5 Comparison of plasma angiotensin II levels (pAT-II) determined by the direct radioimmunoassay (direct) and the assay using Dowex column extraction (Dowex).

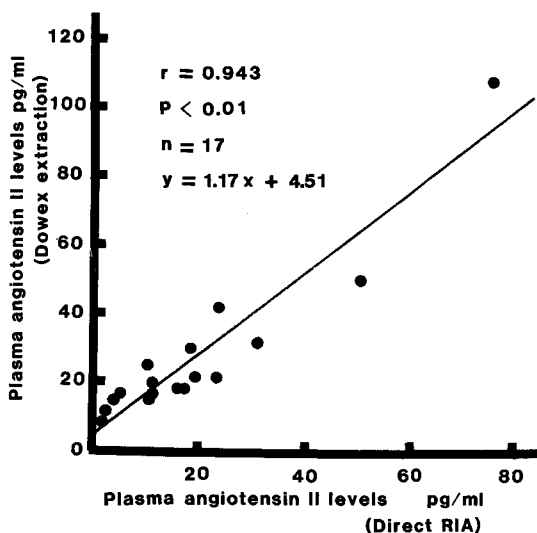


Fig. 6 Comparison of the direct radioimmunoassay (Direct RIA) and the assay using Dowex column extraction. Correlation is significant at $p < 0.01$.

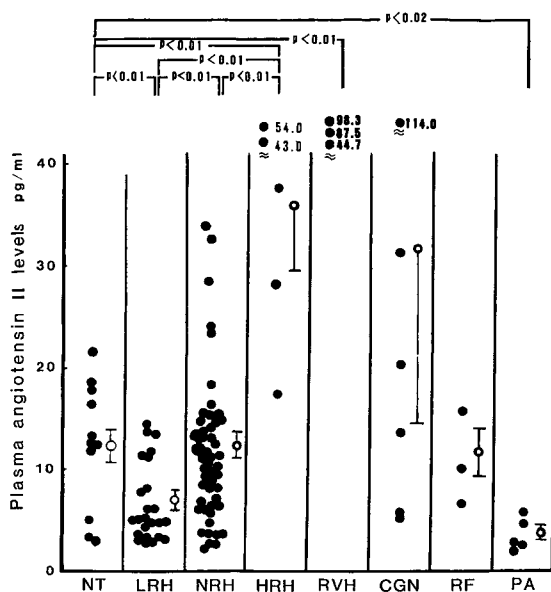


Fig. 7 Plasma angiotensin II levels in normotensives (NT), low (LRH), normal (NRH) and high renin essential hypertensives (HRH), the patients with renovascular hypertension (RVH), non-renal failure (CGN) and renal failure groups of chronic glomerulonephritis with hypertension (RF), and the patients with primary aldosteronism (PA).

76.7 \pm 16.4 (44.7~98.3), 31.8 \pm 16.9 (5.4~114), 10.5 \pm 2.7 (6.6~15.9), 3.2 \pm 0.6 pg/ml (1.8~4.8 pg/ml)であった。

本態性高血圧患者においては、低 renin 群は正常血圧及び正、高 renin 患者群に比し有意な低値 ($p < 0.01$) を示した。他方、高 renin 群は正常血圧者及び、正 renin 群に比し、有意の高値 ($p < 0.01$) となった。二次性高血圧症においては、腎血管性高血圧患者が正常血圧者に比し有意の高値 ($p < 0.01$) を、原発性 aldosterone 症患者では有意の低値 ($p < 0.02$) を示した。

3.9 Captopril 投与下の血漿 angiotensin II 濃度

3 例の本態性高血圧患者に captopril を投与した際の血漿 angiotensin II 濃度の変化を Fig. 8 に示す。

3 例の患者すべてにおいて、血漿 angiotensin II 濃度は投与後 30 分から 180 分の間で明らかな低下をみた。平均血漿 angiotensin II 濃度は投与前及び投与後 30 分、60 分、120 分、180 分がそれぞれ 10.5 \pm 1.1, 3.6 \pm 0.3, 3.6 \pm 1.1, 3.5 \pm 0.9, 3.3 \pm 1.1 pg/ml となり captopril 投与後、血漿 angiotensin II 濃度は投与前に比し顕著に ($p < 0.01$) 低下した。

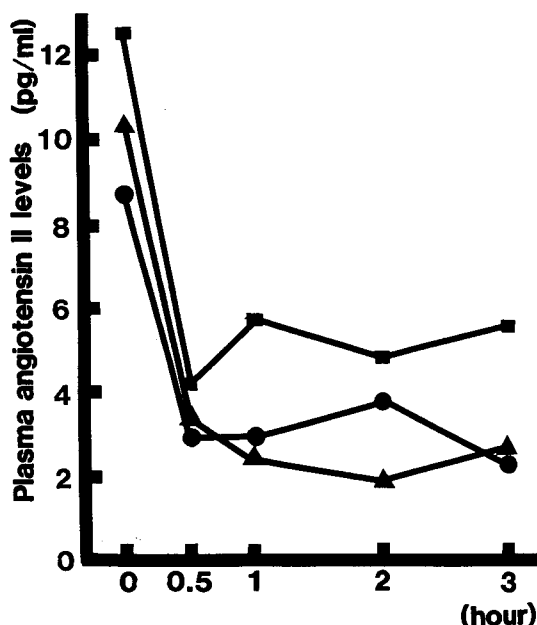


Fig. 8 The effect of converting enzyme inhibitor (captopril) administration on plasma angiotensin II levels in 3 in-patients with essential hypertension. Plasma angiotensin II levels decreased significantly after captopril administration.

4 考 察

Renin-angiotensin 系は prorenin, renin, angiotensinogen, angiotensin I, angiotensin I converting enzyme, angiotensin II, angiotensin III, angiotensinases などの諸要素から成り立っている。今日迄、本系活性の指標として主に血漿 renin 活性が用いられてきたが、本系の、生理活性物質である angiotensin II については、測定法上の困難さ故にその報告は限られていた。そこで、本研究では、より簡便でかつ高感度の angiotensin II の測定法を開発すべく、その検討を試みた。その結果、抽出操作の不要な、direct radioimmunoassay 系を確立することに成功した。このことは次の事実より支持された。つまり、本測定法では、抽出操作を行わずとも、まずヒト血漿試料は angiotensin II の標準曲線と常に平行関係を示すこと、第 2 に、既知量の合成 angiotensin II を血漿に加えた際の回収率が、ほぼ 100% を示すこと、第 3 には direct radioimmunoassay 法による測定値と従来の Dowex 抽出法^{7,9,11)} によるそれとが非常に近似し、さらにこれら両者間に極めて良好な正相関係がえられたことである。本測定法による血漿 angiotensin II 濃度は、ま

ず、正常者は 12.2 ± 1.9 pg/ml と計測された。この正常値は後述の如く、我々の以前の報告、及び、他の報告に比べほぼ同様の値であった。正常者において正常下限の値を、しかも少量の血漿試料で正確に測定するには、極めて高い感度の測定系が必須となる。本研究で開発された測定系の感度は 0.1 pg/tube であり、この値は従来のいずれの測定系⁸⁻¹⁶⁾ に比してもはるかに高い感度を示し、実際には 100 μ l の微量検体で、1.0 pg/ml の濃度までの測定が可能となった。本研究で血漿 angiotensin II の direct radioimmunoassay を可能にした最大の理由は、この高感度を有する高力価の抗体の作製に成功したことにあると思われた。

次に、本研究で得られた angiotensin II の抗体は angiotensin III, angiotensin I とそれぞれ 100%, 0.1% 以下の交差を示すことが明らかにされた。つまり、本抗体は angiotensin II の C 末端に特異的な抗体である事を示唆するものと考えられる。従って、本測定系は angiotensin II のみならず、angiotensin III をも同時に測定している可能性が極めて高い。しかし、既に我々が検討した、angiotensin I 及び angiotensin II との交差を示さない特異的な angiotensin III の測定系を用いた成績²¹⁾ では、正常者の血漿 angiotensin III 濃度は極めて低い値で、3 pg/ml 以下を示し、正常者のほとんどが測定感度以下であったことから、研究で得られた測定値は、現実的には angiotensin II 自体の値を示すものと考えて大きな間違いはない。

他方、近年 angiotensin I 変換酵素阻害剤が降圧剤として注目され¹⁻⁴⁾、本剤の主要な降圧機序に angiotensin II の抑制が推測される¹⁻⁴⁾。勿論、この点を明らかにするためには血漿中の angiotensin II の動態を正確に計測することが必須となる。ただ、従来の測定系に用いられる angiotensin II の抗体は angiotensin I との交差が少なくなく、ことさら、変換酵素阻害剤投与下では血漿の renin 活性と同時に angiotensin I も明らかに増加し、些細な交差も大きな誤差を生ずる原因となる。そして、事実上既報の測定法では、変換酵素阻害剤投与下の angiotensin II 濃度を正確に追跡することを困難ならしめていた。本研究で開発された測定法は、この点でも極めて意義深いものであり、極めて高い感度に加えて、angiotensin I との交差が極端に小さく、0.1% 以下であることから、変換酵素阻害剤 captopril 投与下でも血漿 angiotensin II 濃度を容易に、しかも正当に評価することを得た。

正常者での早朝安静臥床下における循環血漿中の angiotensin II 濃度は 10 pg/ml 前後と計測され、この

値は我々が、従来用いた Dowex 抽出法での値¹⁶⁾や、現在まで得られた諸家の報告⁹⁻¹⁵⁾ともによく一致した。他方、本態性高血圧患者の血漿 angiotensin II 濃度は、正常血圧者に比し正 renin 群がほぼ同等の値を示し、低 renin 群はより低値となり、高 renin 群では有意の高値となった。すなわち、本態性高血圧患者では血漿 angiotensin II は血漿 renin 活性とほぼ同様の血中動態をとるものと思われた。

二次性高血圧症においては、血漿 renin 活性が高値を示す腎血管性高血圧患者では、正常対照に比し有意な高値を、血漿 renin 活性が低値の原発性 aldosterone 症患者は有意な低値を示した。慢性糸球体腎炎による腎実質性高血圧症患者では、血漿 angiotensin II 濃度は正常値から極めて高値を示すものまで広い範囲で分布しており、これも血漿 renin 活性と一致する成績であった。また、尿毒症を示す腎実質性高血圧症患者では、血漿 angiotensin II 濃度が正常範囲内にあった。この様に基礎値としては、今回検討した症例の枠内では、血漿 angiotensin II 濃度は血漿 renin 活性とおおよそ類似の血中動態を示すものと推測された。従来、renin-angiotensin 系の指標として用いられてきた血漿 renin 活性は、測定上血漿を incubate し、control との差より産出される angiotensin I を測定するという煩雑な操作を必要としていた。更に、renin-angiotensin 系の生理活性物質は angiotensin II であり、今回の測定法では、100 μ l の血漿検体を用いて直接測定が可能となり、むしろ血漿 renin 活性測定よりは簡便なものとなった。本態性高血圧や二次性の高血圧症における renin-angiotensin 系の活性の把握と、この系の病態生理学的役割を検索する上で、本法のような方法で、血漿 angiotensin II 濃度を測定することが、初めてその動態をより直接的に検討しうるものとなしえたと考えたい。以上、我々は、従来の報告に比し、簡便かつ特異性の優れた angiotensin II の測定法の確立に成功した。本測定法は本態性高血圧症をはじめ、各種高血圧症、腎疾患、循環器疾患や、水、電解質代謝における renin-angiotensin 系の生理的、病態生理的役割を解明する上で、極めて有用な手段になりうると思われた。

5 結 語

高力価の抗体と高比放射能の標識抗原の組み合わせにより、高感度、かつ特異的、さらに抽出操作不要な血漿 angiotensin II の direct radioimmunoassay を確立した。

1. 抗体は以下のごとくしてえた。すなわち、carbodiimide 法により、合成 angiotensin II をウシ血清アルブミンと結合させ、complete Freund's adjuvant でエマルジョン化したものを用いて家兎を免疫した。最終免疫後 4 カ月目に最終希釈 150 万倍で標識抗原と 30~35% の結合を示す高力価な抗体を得た。

2. 標識抗原は chloramine T 法の変法により、合成 angiotensin II を¹²⁵I で標識して作製した。比放射能は 1,600 μ Ci/ μ g と良好で、最小検出量 0.1 pg/tube と極めて高い感度を示した。

3. 上述抗体は angiotensin I との交差反応が 0.1% 以下であったが、angiotensin III とは 100% の交差を示した。ただし、血漿 angiotensin III 濃度は極めて低値（既報）で、本研究で計測された測定値は、ほぼ angiotensin II 濃度を示すものと考えられた。

4. ヒト血漿の用量反応曲線 angiotensin II の標準曲線と良好な平行関係を示した。さらに、本 direct radioimmunoassay の測定値は、従来の Dowex 抽出法によるそれと有意差を認めず、かつ両測定値の間に良好な正相関が得られた。以上により、本研究では、100 μ l の血漿検体にて測定可能な簡便、かつ高感度な angiotensin II の direct radioimmunoassay 法を確立した。

5. 本測定法によるヒト血漿 angiotensin II 濃度は、正常血圧者、本態性高血圧症の低 renin 群、正 renin 群、高 renin 群、腎血管性高血圧患者、慢性糸球体腎炎の非腎不全例、同腎不全例、原発性 aldosterone 症患者、それぞれで 12.2 ± 1.9 (11 例)、 6.1 ± 0.8 (24 例)、 12.2 ± 1.4 (50 例) 36.0 ± 6.3 (5 例)、 76.7 ± 16.4 (3 例)、 31.8 ± 16.9 (5 例)、 10.5 ± 2.7 (3 例)、 3.2 ± 0.6 (5 例) pg/ml を示した。

6. 本態性高血圧患者に angiotensin I 変換酵素阻害剤の captopril を投与した際の血漿 angiotensin II 濃度は、投与後 30 分ですでに有意に低下し、その後も 60 分、120 分、180 分で有意な低下を維持した。

以上の如く、本研究で確立した血漿 angiotensin II の測定法は極めて簡便かつ高感度で、本測定系では angiotensin I との交差率が極めて低く、変換酵素阻害剤投与下血漿 angiotensin II 濃度を正確に測定することを可能とした。本法は今後、各種病態における renin-angiotensin 系の役割を一層明らかにする上で、極めて有用な手段の 1 つとなりうると思った。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を頂きました内科学第二講座飯村 攻教授に深謝いたします。

文 献

1. Laragh, J. H., Case, D. B., and Wallace, J. M.: Blockade of renin or angiotensin for understanding human hypertension; a comparison propranolol, saralasin and converting enzyme blockade. *Fed. Proc.* **36**, 1781-1789 (1977).
2. Streeten, D. H. P., Phil, D., Anderson, G. H., Freiberg, J. M., and Dalakos, T. G.: Use of an angiotensin II antagonist (Saralasin) in the recognition of "angiotensinogenic" hypertension. *N. Engl. J. Med.* **292**, 657-662 (1975).
3. Ogihara, T., Yamamoto, T., and Kumahara, Y.: Angiotensin blockade. *Lancet* **1**, 219 (1974).
4. Vinci, J. M., Horwitz, D., Zusman, R. M., Pisano, J. J., Catt, K. J., and Keiser, H. R.: The effect of converting enzyme inhibition with SQ 20, 881 on plasma and urinary kinin, prostaglandin E, and angiotensin II in hypertensive man. *Hypertension* **1**, 416-426 (1979).
5. McCaa, R. E., Hall, J. E., and McCaa, C. S.: The effects of angiotensin I converting enzyme inhibitors on arterial blood pressure and urinary sodium excretion. Role of the renal renin-angiotensin and kallikrein-kinin system. *Circ. Res.* **43** (Suppl. 1), 32-39 (1979).
6. Bravo, E. L., and Tarazi, R. C.: Converting enzyme inhibition with an orally active compound in hypertensive man. *Hypertension* **1**, 39-46 (1979).
7. Johnston, C. I., Millar, J. A., McGrath, B. P., and Matthews, P. G.: Long-term effects of captopril (SQ 14,225) on blood pressure and hormone levels in essential hypertension. *Lancet* **2**, 493-495 (1979).
8. Vallotton, M. B., Page, L. B., and Haber, E.: Radioimmunoassay of angiotensin in human plasma. *Nature* **215**, 714-715 (1967).
9. Boyd, G. W., Landon, J., and Peart, W. S.: The radioimmunoassay of angiotensin II. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* **173**, 327-338 (1969).
10. Dusterdieck, G., and McElwee, G.: Estimation of anghotensin II concentration in human plasma by radioimmunoassay; Some application to physiological and clinical states. *Eur. J. Clin. Invest.* **2**, 32-38 (1971).
11. Catt, K. J., Cran, E., Zimmet, P. Z., Best, J. B., Cain, M. D., and Coghlan, J. P.: Angiotensin II blood-levels in human hypertension. *Lancet* **1**, 459-464 (1971).
12. Cain, M. D., Coghlan, J. P., and Catt, K. J.: Measurement of angiotensin II in blood by radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* **39**, 21-34 (1972).
13. Kappelgaard, A. M., Nielsen, M. D., and Giese, J.: Measurement of angiotensin II in blood by radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* **67**, 299-306 (1976).
14. Walker, W. G., Moore, M. A., Horvath, J. S., and Whelton, P. K.: Arterial and venous angiotensin II in normal subject. Relation to plasma renin activity and plasma aldosterone concentration, and response to posture and volume changes. *Circ. Res.* **38**, 477-483 (1976).
15. Swales, J. D., and Thurston, H.: Plasma renin and angiotensin II measurement in hypertensives and normal subjects; Correlation of basal and stimulated states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **45**, 159-163 (1977).
16. Kobayashi, H., Shimamoto, K., Moriguchi, O., and Miyahara, M.: A sensitive radioimmunoassay for the determination of plasma angiotensin II in human subjects. *Jpn. Circ. J.* **43**, 727-733 (1979).
17. Goodfriend, T. L., Levine, L. and Fasman, G. D.: Antibodies to bradykinin and angiotensin; a use of carbodiimides in immunology. *Science* **144**, 1344-1346 (1964).
18. Greenwood, F. C., Hunter, W. M., and Glover, J. S.: The preparation of ¹³¹I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89**, 114-123 (1963).
19. Desbuquois, B., and Aurbach, G. D.: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 732-738 (1971).
20. Kikuchi, K., Miyama, A., Nakao, T., Takigami, Y., Kondo, A., Mito, T., Ura, N., Tsuzuki, M., and Iimura, O.: Hemodynamic and natriuretic responses to intravenous infusion of dopamine in patients with essential hypertension. *Jpn. Circ. J.* **46**, 486-493 (1982).
21. 小林博昭, 島本和明, 細田 晋, 中橋泰之, 安藤利昭, 飯村 攻: ヒト血漿 Angiotensin III の Radioimmunoassay (RIA) に関する研究. *日内分泌誌* **58** (Suppl.), 1231 (1982).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第2講座 島本和明